

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平3-170864

⑫ Int. Cl.³

G 01 N 33/542
33/533

識別記号

A

庁内整理番号

7906-2G
7906-2G

⑬ 公開 平成3年(1991)7月24日

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全7頁)

⑭ 発明の名称 蛍光偏光法によるリガンドの測定法

⑮ 特 願 平2-280302

⑯ 出 願 平2(1990)9月27日

優先権主張 ⑰ 1989年9月28日 ⑱ 米国(US) ⑲ 414177

⑳ 発 明 者 デビット・アール・ブロンスキ アメリカ合衆国ウイスコンシン 53142、ケノシヤ、フイフティサード・アベニュー 4212番
㉑ 発 明 者 チャールズ・エイ・フレンティジ アメリカ合衆国イリノイ 60046、レイク・ビラ、フェアビュー・レーン 37338番
㉒ 発 明 者 デビット・ジェイ・ホークスワース アメリカ合衆国イリノイ 60061、バーノン・ヒルズ、レイクサイド・ドライブ 709番
㉓ 出 願 人 アボット・ラボラトリーズ アメリカ合衆国イリノイ 60064-3500、アボット・パーク、ワン・アボット・パーク・ロード (番地の表示なし)
㉔ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

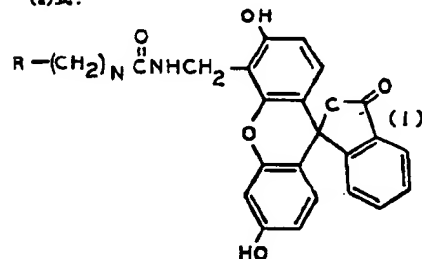
蛍光偏光法によるリガンドの測定法

2. 特許請求の範囲

(1) 試料中のリガンドの測定法であって、

(i) 試料を

(a) 式:



(式中、Rはリガンド、またはリガンド類似体であって、測定しようとするリガンドとトレーサー化合物中のリガンドまたはリガンド類似体とがともに所定の抗体により特異的に認識されるように該測定しようとするリガンドと共通するエピトープを少なくとも一つ有するリガンド類似体、Nは1~10の整数である)で示されるトレーサー化

合物、または

(b) 該トレーサー化合物の生物学的に許容し得る塩、

(c) 測定しようとするリガンドとトレーサー化合物とをともに特異的に認識し得るモノクローナル抗体、および

(d) 該モノクローナル抗体の溶液の一部として添加したグリセロールであって、該モノクローナル抗体の安定性を高めるのに充分な量で該溶液中に存在するグリセロールと混合し、ついで

(ii) 該抗体に結合したトレーサー化合物の量を蛍光偏光法により測定して試料中のリガンドの量を決定する

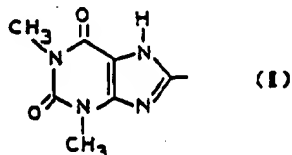
ことを特徴とする方法、

(2) グリセロールが、モノクローナル抗体溶液中に約5重量%~約20重量%の量で存在する、請求項(1)に記載の方法、

(3) グリセロールが、蛍光偏光法に供する試料に添加するモノクローナル抗体溶液の約10重量

等を構成する、請求項(1)に記載の方法。

(4)式(1)で示されるトレーサー化合物においてRが式:

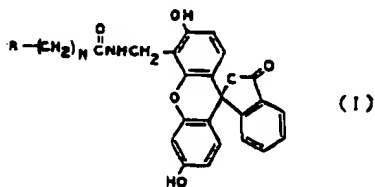


で示される構造を有し、Nが1~10の整数である、請求項(1)に記載の方法。

(5)グリセロールが、モノクローナル抗体溶液中に約5重量%~約20重量%の量で存在する、請求項(4)に記載の方法。

(8)グリセロールが、蛍光偏光法に供する試料に添加するモノクローナル抗体溶液の約10重量%を構成する、請求項(4)に記載の方法。

(7)測定しようとするリガンドと式:



ロン酸(valproic acid)などの生物学的対象物のレベルを決定するために蛍光偏光法を用いることは、たとえば1986年6月3日にワング(Wang)らに特許された米国特許第4,593,089号明細書などに開示されていることが知られている。該特許明細書には、例を挙げて試料中のバルプロン酸レベルを決定する方法が開示されており、その方法によれば、トレーサーとしての2-エチル-5-アミノペンタン酸-5-[(4,8-ジクロロトリアジン-2-イル)アミノ]フルオレセイン結合体、およびバルプロン酸と該トレーサーとをともに認識する抗体としてのヒツジ抗バルプロン酸抗体を試料と混合する。バルプロン酸(リガンド)とトレーサーとはともに抗体と複合体を生成する。トレーサーおよび抗体の濃度はともに一定に保っておき、生成したトレーサー/抗体複合体に対するリガンド/抗体複合体の比が試料中に存在するリガンドの量に正比例するようにする。それゆえ、上記混合物を偏光で励起させ、トレーサーおよびトレーサー/抗体複合体により放射さ

(式中、Rはリガンドまたはリガンド類似体、Nは1~10の整数である)で示されるトレーサー化合物とをともに特異的に認識し得るモノクローナル抗体、および溶液中のモノクローナル抗体の安定性を有意に高めるのに充分な量のグリセロール、からなる緩衝溶液。

(8)グリセロールが溶液の約5重量%~約20重量%を構成する、請求項(7)に記載の溶液。

(9)グリセロールが溶液の約8重量%~約12重量%を構成する、請求項(7)に記載の溶液。

(10)グリセロールが溶液の約10重量%を構成する、請求項(7)に記載の溶液。

3.発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、蛍光偏光法を用いた、試料(血清、血漿、尿など)中に存在する生物学的対象物(たとえば、テオフィリンなどのリガンド)レベルの決定方法に関する。

(従来の技術および発明が解決しようとする課題)

試料(血清、血漿、尿など)中に存在するバルブ

れる蛍光の偏光を測定することにより、試料中のリガンドの量を蛍光偏光法で測定することができる。

上記ワングらの特許明細書にも開示されているように、蛍光偏光法には、幾つかの試料(あるものは既知であり、あるものは未知である)の蛍光の偏光を測定し、既知試料のデータから濃度の関数としての偏光を示す標準曲線を作成し、ついでこの標準曲線を用い、測定した偏光から未知試料の濃度を決定することが含まれる。この特許明細書にはまた該方法を種々のリガンドの濃度を決定するために用いることができることも開示されており、そのようなリガンドの例として、エストロン、エストラジオール、コルチゾル、テストステロン、プロゲステロン、ケノデオキシコル酸、ジブキシシン、コル酸、リグトキシシン、デオキシコル酸、リトコル酸(lithocholic acid)、およびそれらのエステルおよびアミド誘導体などのステロイド類;ビタミンB-12、尿酸、チロキシン、トリヨードチロニン、ヒスタミン、セロト

ニン、プロスタグランジン類(PGE、PGF、PGAなど)などのビタミン類;テオフィリンなどの抗喘薬;アドリアマイシンやメトトレキセートなどの抗腫瘍剤;ディソピラミド、リドカイン、プロカインアミド、プロプラノロール、キニジン、N-アセチルプロカインアミドなど抗不整脈剤;フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルブロン酸、カルバマゼピンおよびエトサクシミドなどの抗痙攣剤;ペニシリン類、セファロスポリン類、エリスロマイシン、バンコマイシン、ゲンタマイシン、アミカシン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシンおよびトブラマイシンなどの抗生物質;サリチル酸塩などの抗関節炎剤;ノルトリプチリン、アミトリプチリン、イミプラミンおよびデシプラミンなどの三環系抗うつ薬を含む抗うつ薬;など、およびそれらの代謝産物が挙げられている。

試料(血清、血漿、尿など)中に存在する生物学的対象物(たとえば、バルブロン酸)のレベルを決定するための蛍光偏光法において、ある種のアミ

ノン、ホルコジン(pholcodine)、デキストロメトルファン、フェナゾシンおよびデオニン(deonia)およびそれらの代謝産物などの乱用薬物も該方法により決定することができることを開示している。(問題を解決するための手段)

本発明は、測定しようとするリガンド、モノクローナル抗体および一群のアミノメチルフルオレセイントレーサーの構成員の一つを含む系で蛍光偏光法を用いて種々のリガンドを測定する方法において、該系にグリセロールを含ませることにより、該系中のモノクローナル抗体の安定性が、そのような測定を行うために従来用いられてきた系中でのモノクローナル抗体の安定性に比べて予期せず、また有意に増大するという発見に基づいている。本発明の方法により測定することのできるリガンドとしては、エストロン、エストラジオール、コルチゾル、テストステロン、プロゲステロン、ケノデオキシコル酸、ジゴキシン、コル酸、ジギトキシン、デオキシコル酸、リトコル酸、およびそれらのエステルおよびアミド誘導

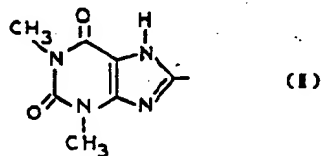
ノメチルフルオレセインをトレーサーとして用いることができることもまた知られている。その例として、たとえばキルケモ(Kirkemo)らに1985年4月9日に特許された米国特許第4,510,251号明細書には試料中のエストリオールおよびコルチゾルのレベルを決定する方法が開示されており、該方法は、それぞれトレーサーとしてのエストリオールカルボキシメチロキシムアミノメチルフルオレセインおよびコルチゾル-3-カルボキシメチロキシムアミノメチルフルオレセイン、およびそれぞれ抗体としてのエストリオールに対して産生した抗血清およびコルチゾルに対して産生した抗血清を試料と混合し、ついでトレーサー/抗体結合体の量を蛍光偏光法により決定することが含まれる。キルケモらの特許明細書は、上記に挙げたリガンドを所定の方法により測定することができることを開示しているとともに、モルヒネ、ヘロイン、ヒドロモルホン、オキシモルホン、メタポン(salspon)、コデイン、ヒドロコドン、ジヒドロコデノン、ジヒドロヒドロキシコデ

体などのステロイド類;ビタミンB-12、葉酸、チロキシン、トリヨードチロニン、ヒスタミン、セロトニン、プロスタグランジン類(PGE、PGF、PGAなど)などのビタミン類;テオフィリンなどの抗喘薬;アドリアマイシンやメトトレキセートなどの抗腫瘍剤;ディソピラミド、リドカイン、プロカインアミド、プロプラノロール、キニジン、N-アセチルプロカインアミドなど抗不整脈剤;フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルブロン酸、カルバマゼピンおよびエトサクシミドなどの抗痙攣剤;ペニシリン類、セファロスポリン類、エリスロマイシン、バンコマイシン、ゲンタマイシン、アミカシン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシンおよびトブラマイシンなどの抗生物質;サリチル酸塩などの抗関節炎剤;ノルトリプチリン、アミトリプチリン、イミプラミンおよびデシプラミンなどの三環系抗うつ薬を含む抗うつ薬;モルヒネ、ヘロイン、ヒドロモルホン、オキシモルホン、メタポン、コデイン、ヒドロコドン、ジヒドロコデノン、ジ

はナノグラムを意味する。cmはセンチメートルを意味する。mmはミリメートルを意味する。ℓはリットルを意味する。μℓはマイクロリットルを意味する。m/oはモルパーセントを意味し、組成物中の所定成分のモル数を組成物中の全モル数で除して100倍したものである。v/vは容積%を意味する。Mはモルを意味し、溶液ℓ中の溶質のモル数である。psiはポンド/平方インチを意味する。MPaは10⁵パスカルを意味する。温度は特

実施例

式(1)で示されるテオフィリン-アミノメチルフルオレセイン誘導体(式中、Nは5であり、Rは式:



で示される基である)を、テトラヒドロフラン(4.0g)中に溶解した8-カルボキシペンチルテオ

フィリン(6.0g)、N-ヒドロキシサクシニミド(26.0g)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(46.0g)およびアミノメチルフルオレセイン(81.0g)(米国特許第4,614,823号明細書、実施例2参照)から製造した。上記N-ヒドロキシサクシニミドおよびジメチルホルムアミド(2g)を上記8-カルボキシペンチルテオフィリンに加え、約20℃の室温にて3時間反応させた。ついで、上記アミノメチルフルオレセインおよびジメチルホルムアミド(2g)を反応混合物に加えた。室温にて反応を完了まで進行させたが、これには約15分を要した。ついで溶液を真空中に除いて粗製の生成物を得、これを15%v/vメタノールを含有する塩化メチレンからなる溶液中に溶解し、プレパラティブ薄層クロマトグラフィーにより精製した。

ついで、上記で得たテオフィリン-アミノメチルフルオレセイン誘導体を、蛍光偏光イムノアッセイにおいてトレーサーとして用いた。蛍光偏光イムノアッセイは下記のように行った。

(1)容量を測定した標準血清または被験血清を試験管に送り、緩衝液で希釈する。

(2)ついで、既知濃度の本発明トレーサーを各試験管に加える。

(3)既知濃度の抗血清を試験管に加える。

(4)反応混合物を35℃にてインキュベートする。ついで

(5)モノクローナル抗体に結合したトレーサーの量を蛍光偏光法により測定し、試料中のリガンド(血清)の量を測定する。

イムノアッセイには下記材料を用いた。

1. 0.1M緩衝液(pH 7.5)(0.01%ウシガンマグロブリン(BGG)および0.1%アジ化ナトリウムを含有する「トリス(TRIS)」の商品名で市販されている)中の上記で製造したテオフィリン-アミノメチルフルオレセイントレーサー。

2. 0.1%アジ化ナトリウム、1.0%ニフト卵アルブミン加水分解物および0.9%塩化ナトリウムを含有する10%水性グリセロール中の、マウス腹水から得た抗テオフィリンモノクローナ

ル抗体抗血清。

3. 2.5% 5-スルホサリチル酸塩および0.1M TRIS溶液からなる前処理溶液。

4. ヒト血清またはテオフィリンを含有する他の生物学的流体の試料。

5. キュベット、キュベットとして用いる10×75mmガラス培養管。

6. ±0.001単位の精度で蛍光偏光を測定可能な蛍光計。

アッセイ法には下記工程が含まれていた。

1. 試料(21.6μℓ)を抗血清(25μℓ)および前処理溶液(25μℓ)とともに前希釈コンテナ中にピペットにて入れた。前希釈コンテナ中の溶液の容量をBGG緩衝液で約500μℓに希釈した。

2. 前希釈コンテナから上記溶液(175μℓ)をピペットにてキュベット中に入れ、BGG緩衝液で最終容量0.99ℓまで希釈した。

3. キュベットの中身をよく混合した。3分後、蛍光偏光のバックグラウンド決定を行った。

ヒドロヒドロキシコデイノン、ホルコジン、デキストロメトルファン、フェナゾシンおよびデオニンおよびそれらの代謝産物などの乱用薬物などが挙げられるが、これらに限られるものではない。本発明は特に、アミノメチルフルオレセイントレーサーを認識することのできるモノクローナル抗体の緩衝溶液の安定性が、該溶液中に約5%(重量%, 以下同じ)~約20%、好ましくは約8%~約12%、最も好ましくは約10%のグリセロールを含ませることにより予期せず、かつ有意に増大すること、およびそのようなグリセロールの存在が当面の測定を妨害しないことの見解に基づいている。

従って、本発明の態様の一つは、試料中のリガンドの測定法であって、

(i)試料を

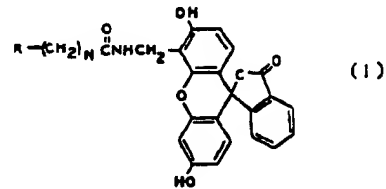
(a)式:

と混合し、ついで

(ii)該抗体に結合したトレーサー化合物の量を蛍光分光法により測定して試料中のリガンドの量を決定する

ことを特徴とする方法である。本発明の方法を行うに際して試料中に用いるグリセロールは、該モノクローナル抗体を含有する溶液の一部として導入する。該抗体溶液中のグリセロールの量は、該モノクローナル抗体の安定性を有意の範囲まで高めるのに充分なものでなければならない。モノクローナル抗体溶液中のグリセロールが5%~20%であるとモノクローナル抗体の安定性を高めるのに有効であるが、該溶液が30%のように上記範囲を逸脱するグリセロールを含有するときはモノクローナル抗体の安定性は減少することがわかった。

本発明の別の態様は、測定しようとするリガンドと式:

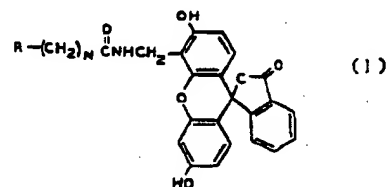


(式中、Rはリガンド、またはリガンド類似体であって、測定しようとするリガンドとトレーサー化合物中のリガンドまたはリガンド類似体とがともに所定の抗体により特異的に認識されるように該測定しようとするリガンドと共通するエピトープを少なくとも一つ有するリガンド類似体、Nは1~10の整数である)で示されるトレーサー化合物、または

(b)該トレーサー化合物の生物学的に許容し得る塩、

(c)測定しようとするリガンドとトレーサー化合物とをともに特異的に認識し得るモノクローナル抗体、および

(d)グリセロール



(式中、Rはリガンドまたはリガンド類似体、Nは1~10の整数である)で示されるトレーサー化合物とをともに特異的に認識し得るモノクローナル抗体、および溶液中のモノクローナル抗体の安定性を有意に高めるのに充分な量のグリセロール、からなる緩衝溶液である。

本発明は、下記実施例により一層充分に理解されるであろう。この実施例は、本発明者が現在のところ考え得る最良の態様であるが、説明のみを目的としたものであり、本発明を限定することを意図したものではない。

本明細書において「%」および「部」は、特に断らない限り重量%および重量部を意味する。gはグラムを意味する。mgはミリグラムを意味する。ng

4. 前希釈混合物をさらに175 μ lとトレーサー(25 μ l)をキュベットに加え、BGG緩衝液を加えてキュベット中の全容量を約2.0mlとした。

5. キュベットの中身をよく混合し、35℃にて7分インキュベートした。

6. ついで、適当な装置(蛍光計)を用い、キュベット中の組成物の蛍光偏光値を決定した。

0~40 ng/mlの濃度のテオフィリンを含有する一連の血清標準の結果は下記の通りであった。

テオフィリン濃度(ng/ml)	偏光
0.00	0.265
2.50	0.232
5.00	0.204
10.00	0.162
20.00	0.116
40.00	0.079

種々の濃度のグリセロールでの安定性を調べるため、0.1%アジ化ナトリウム、1.0%ニワトリ卵アルブミン加水分解物および0.9%塩化ナトリウムを含有する10%水性グリセロール中の

*3: 2~8℃にて2ヶ月間貯蔵した後の試料

上記データは、2つの血清テオフィリン試料の安定性が充分なものであることを示している。しかしながら、比較のため本発明に従うことなく、一つは30%のグリセロールを含有する以外は同一の試料、他はグリセロールを含有しない以外は同一の試料を上記安定性試験に供したところ、いずれもアッセイにおいてより大きな変動がみられ、安定性は不十分であると思われた。

上記実施例において8-カルボキシベンチルテオフィリンの代わりに他の8-カルボキシアルキルテオフィリンを等価量用いることにより、本発明の方法に使用するための他のテオフィリン-アミノメチルフルオレセイントレーサーを製造することができること、および他のカルボキシアルキルリガンドを等価量用いることにより他のリガンド-アミノメチルフルオレセイントレーサーを製造することができることが了解されるであろう。同様にカルボキシアルキルリガンド類似体を代わりに用いることにより、トレーサーとしてリガン

マウス腹水由来抗テオフィリンモノクローナル抗体抗血清(以下、「10%グリセロール」という)、並びに20%グリセロールを含有する他は同一の他の抗血清(以下、「20%グリセロール」という)を調製した。ついで、これらの抗血清を用い、下記(a)~(c)のそれぞれの血清テオフィリン試料について上記アッセイ法の1~6の工程を行うことによりアッセイした。

(a)新たに調製した試料

(b)45℃にて種々の期間貯蔵した試料

(c)2~8℃にて種々の期間貯蔵した試料

新たに調製した血清テオフィリン試料、45℃にて7日間貯蔵した後の血清テオフィリン試料、および2~8℃にて2ヶ月間貯蔵した後の血清テオフィリン試料のそれぞれ2つの試料について調べた偏光を下記にまとめた。

	*1	*2	*3
10%グリセロール	108.73	199.84	204.46
20%グリセロール	201.97	193.45	197.88

(注)*1: 新たに調製した試料

*2: 45℃にて7日間貯蔵した後の試料

ド類似体-アミノメチルフルオレセインを製造することができる。同様に、他のリガンド-アミノメチルフルオレセインおよびリガンド類似体-アミノメチルフルオレセイントレーサーおよびそのようなすべてのトレーサーの生物学的に許容し得る塩を適当なモノクローナル抗体とともに上記実施例の手順に用いて他のリガンドを決定するのに用いることもできる。測定しようとするリガンドおよびトレーサー中のリガンドもしくはリガンド類似体は少なくとも一つの共通するエピトープを有していなければならない、モノクローナル抗体はリガンドとトレーサーの両方を特異的に認識することができなければならない。

特許出願人 アボット・ラボラトリーズ

代理人 弁理士 青山 高橋か1名

特開平3-170864 (7)

第1頁の続き

④発 明 者 チャールズ・ダブリ アメリカ合衆国イリノイ 60090、ホイーリング、ハムコ
 ユ・ベニントン・ジュ ート 552番
 ニア